

■原 著■ 2020 年度 神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ラット精巣におけるオキシトシン・オキシトシン受容体の局在

鄭 美帆¹ 伊藤隆志² 坂本竜哉² 小谷 享¹ 坂本浩隆² 越智拓海^{1,2,3}

Localization of Oxytocin and Oxytocin Receptors in the Rat Testis

Miho Zun¹, Takashi Ito², Tatsuya Sakamoto², Susumu Kotani^{1,3},
Hirotaka Sakamoto² and Takumi Oti^{1,2,3,4}

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka, Kanagawa 259-1293, Japan

² Ushimado Marine Institute (UMI), Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Ushimado, Setouchi, Okayama 701-4303, Japan

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: oti-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A hormone oxytocin (OXT) is known to regulate female reproductive functions, such as milk ejection and parturition, thereby it is generally termed the 'female hormone'. Recently, it was reported that *Oxt* and *OXT receptor (Oxtr)* mRNA are expressed in the rat testis, and OXT promotes sperm transport and androgen synthesis. It has been suggested that OXT, which is locally synthesized in the testis, is involved in the male reproductive function. However, the localization of OXT or OXTR-expressing cells in the testis is unknown. The purpose of this study was to clarify the localization of OXT- and OXT receptor-expressing cells in the rat testis using OXTR-related mutant rats. First, using RT-PCR, it was confirmed that both *Oxt* and *Oxtr* mRNA were expressed in the wild-type rat testis, although the expression level of *OXT* mRNA was very low. In addition, OXT immunostaining in the wild-type rat testis showed that OXT-immunoreactivity was found in sertoli cells of some seminiferous tubules. Furthermore, OXT immunostaining with the *Oxtr*-td Tomato rat testis showed that OXT-immunoreactivity and tdTomato signals were found in different Sertoli cells of the same seminiferous tubules. These results suggest that OXT and OXTR are simultaneously, but heterotropically, expressed in rat testis Sertoli cells. Sertoli cell OXT may act in a paracrine manner *via* OXTR expressed in nearby Sertoli cells.

Keywords: oxytocin, oxytocin receptor, testis, rat, paracrine

序論

神経ペプチドホルモンの一つであるオキシトシン (OXT) は、視床下部に存在する視索上核と室傍核の神経分泌ニューロンで合成され、下垂体後葉の軸索末端まで輸送されたのち、血中へと放出される。下垂体後葉から放出された OXT は雌の射乳や分娩時の子宮筋収縮に関わるなど¹⁾、雌のホルモンとして知られている。一方で近年、OXT が雄の性機能の調節に関わるなど OXT の雄での機能も着目されている²⁻⁵⁾。

先行研究において、マウスの精子へ OXT を添加すると、精子の運動性が刺激されることから、OXT が

受精に重要な作用を及ぼすと考えられている⁶⁾。ラット精巣内に OXT を投与すると、精巣および精巣上体の重量が増加し、排精時に精子から脱離する残余小体の数が増加する⁷⁾。また、ラットやヤギの精巣組織片に OXT を添加すると、培養液中のテストステロン濃度が減少し、テストステロンの代謝物であり、精巣内のアンドロゲン受容体を介して精子形成に作用する 5 α -ジヒドロテストステロン (DHT) 濃度が増加する⁸⁻¹⁰⁾。さらに、ラットやヒトの精巣、精巣上体、前立腺において、OXT がテストステロンを DHT へと代謝させる酵素の一つである 5 α -リダクターゼ

の発現や活性を促進する^{8, 11, 12)}。これらのことから、OXTが 5α -リダクターゼの発現や活性を増加させることで精子形成に必要なDHTの合成量を増加させ、精子形成に関与すると考えられている^{13, 14)}。また、ラット精巣において*Oxt* および OXT 受容体 (*Oxtr*) mRNA が発現する¹⁵⁾ ことから、精巣で合成される OXT が 5α -リダクターゼ活性に作用し、精子形成に関わることが示唆されるものの、OXT 発現細胞や作用部位である OXTR 発現細胞の局在はいまだ不明である。

そこで本研究では、*Oxtr* 遺伝子改変ラットを用いて、精巣における OXT 発現細胞および OXTR 発現細胞の局在を免疫組織化学的に解析し、精巣における OXT の作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

実験動物

成熟雄ラット (Wistar 系統; 7-11 週齢) と *Oxtr*-Cre ノックインラットと ROSA26 Bacterial artificial chromosome (BAC) 内に CAG-loxP-flanked Neo/STOP cassette- 赤色蛍光タンパク質 (tdTomato) を挿入したレポーターラットを掛け合わせ、OXTR 発現細胞が赤色蛍光シグナルで標識される遺伝子改変ラット [*Oxtr*-tdTomato ラット (Long-Evans 系統; 8-10 週齢) (岡山大学より供与)] を用いた。明期 12 時間 / 暗期 12 時間の環境で、餌と水は自由に摂取できる状態で飼育した。動物実験は、文部科学省の「研究機関における動物実験に関する基本指針」に基づいて行い、岡山大学動物実験委員会、神奈川大学理学部動物実験安全要綱、神奈川大学理学部動物実験委員会の承認を受けて実施した。

Oxt, *Oxtr*, *Gapdh* に対する Reverse Transcriptional-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ラットをイソフルラン深麻酔下で失血死させ、脳と精巣を摘出した。脳はドライアイスで凍結させたのち、 -80°C のディープフリーザーで保管した。その後、18 G 針 (Terumo, NN-1838S) を用いて、室傍核を含む領域をパンチアウトした。一方で、精巣は精

巣鞘膜を取り除き、氷上でホモジュナイズし、RNA 抽出を行った。RNA 抽出は NucleoSpin RNA Kit (Takara bio, Tokyo, Japan) を用い、プロトコルに従って行った。Total RNA の濃度はナンドロップ (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。この Total RNA から Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Strassel, 40724 Hilden, Germany) を用いて、最終濃度 $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ になるように一本鎖 cDNA を合成した。Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0) (Takara bio) と *Oxt* (PCR 産物のサイズ: 378 bp)、*Oxtr* (PCR 産物のサイズ: 559 bp) 特異的にデザインしたプライマーを用いて表のように PCR を行った (表 1)。内部標準としてグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の遺伝子 (*Gapdh*) (PCR 産物のサイズ: 497 bp) を使用した。PCR を行ったサンプルは 2% アガロースゲルで泳動し、Ez-Capture II (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。Second PCR は First PCR 産物を 100 倍希釈し、First PCR と同条件で反応させ、アガロースゲルで電気泳動を行った。

灌流固定およびパラフィン切片・凍結切片作製

成熟雄ラットに三種混合麻酔 (ドミトール $0.3\text{ mg}/\text{kg}$ 、ミダゾラム $4.0\text{ mg}/\text{kg}$ 、ベトルファール $5.0\text{ mg}/\text{kg}$) を腹腔内投与し、深麻酔下で左心室から生理食塩水を灌流して脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Phosphate-buffer (PB) (pH 7.4) 溶液を灌流し、固定した。精巣を摘出した後、4% PFA in 0.1 M PB を用いて 4°C 、一晩で後固定を行なった。組織の一部をトリミングし、エタノールからレモゾールへと置換し、パラフィンへの包埋を行い、マイクロームで $10\ \mu\text{m}$ 厚のパラフィン切片を作製した。パラフィン除去を行った後、HE 染色し、封入・構造の観察を行った。また、一部は 25% スクロース in Phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) 溶液に移し、 4°C 、48 時間以上かけて置換し、凍結保護を行った。トリミング後、炭酸ガスで急速冷凍し、クリオスタット (CM1850, Leica, Nussloch, Germany) を用いて、 $30\ \mu\text{m}$ 厚の凍結切片を作製した。作製した凍結切片はスライドガラスに張り付けし、乾燥させた後、 -20°C で保存した。

表 1. プライマーと PCR 条件

Target gene	Forward primer	Reverse primer	PCR condition (cycle)
<i>Oxt</i>	CTTGGCCTACTGGCTCTGAC	GCGCCCTAAAGGTATCATCA	(94°C 30sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec)x40
<i>Oxtr</i>	TGCTCTTTGAGAAGCTAACAAGATT	AGGTTGGAAAGTAGGAAGAGACATT	(94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec)x38
<i>Gapdh</i>	GGTGAAGGTCGGTGTGAACG	CAAAGTTGTCATGGATGACC	(94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 30sec)x30

免疫組織化学法

OXT 免疫染色

切片を 0.3% Triton X-100 in PBS (T-PBS pH 7.4) で洗浄した。次いで、内因性ペルオキシダーゼを失活させるために、1.0% 過酸化水素 / 60%メタノール溶液に 20 分間浸漬し、その後 T-PBS で洗浄した。さらに、0.3% Triton X-100、1% 正常ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミン、0.05% Na₂S₂O₃ を用いて室温で 30 分反応させ、ブロッキングした。抗 OXT⁺ ニューロフィジン (NP) 抗体 (PS60 ; mouse monoclonal, ATCC, RRID: CVCL_G254;ブロッキングバッファーで 1:1,000 に希釈) あるいは抗 OXT 抗体 (Merck, 4G11, Sigma-Aldrich mouse monoclonal ; 1 : 10,000 希釈) を用いて室温で 1 時間反応させたのち、4℃ で 1 晩反応させた。T-PBS で洗浄後、Biotinylated goat anti-mouse IgG antibody (BA-9200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて室温で 1 時間反応させた。Streptavidin (SAB) -HRP (Nichirei, Tokyo, Japan) で室温、1 時間反応させ、免疫反応産物を 3-3' -ジアミノベンジジン (DAB) を用いて可視化した。脱水透徹を行ったのち、マウントクイック (Daido Sangyo CO., LTD. Japan) で封入した。光学顕微鏡 (BX53; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて画像を取得した。

また、蛍光免疫染色法では、抗 OXT-NP 抗体 (1:1000 希釈) を使用し、Alexa Fluor 488-linked anti-mouse IgG raised in goats (1:1,000 希釈 ; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて室温で 1 時間反応させた。T-PBS で洗浄した後、DAPI 入り Fluoromount G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) を用いて封入した。染色した切片は蛍光顕微鏡 (BX53, Olympus) または共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察し、画像を取得した。

抗体の特異性解析

OXT 抗体の特異性を解析するため、抗 OXT 抗体 (1:10,000 希釈) と抗原ペプチドである OXT ペプチド (50 μg/ml; Anaspec Inc., Fremont, CA, USA) を室温で 1 時間反応させた吸収抗体を用いて免疫染色を行った。抗原ペプチドの代わりに同量の蒸留水を加えて室温で 1 時間反応させた抗体を用いて免疫染色を同時に行った。免疫反応産物は DAB で可視化した。

結果

精巣における *Oxt* /*Oxr* 受容体 mRNA の発現

野生型ラット室傍核および精巣における *Oxt*、*Oxr* mRNA の発現を調べた (図 1)。結果、First PCR

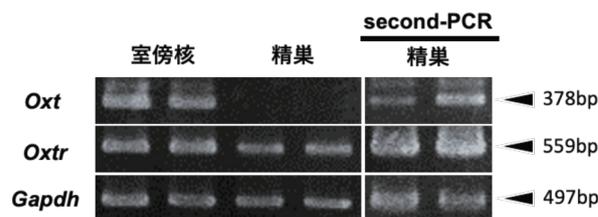


図 1. 室傍核および精巣における *Oxt*、*Oxr*、*Gapdh* mRNA の発現。精巣において *Oxt*、*Oxr* mRNA が発現していた。Second PCR は First PCR 産物を 100 倍希釈し、First PCR と同条件で反応させた。

にて *Oxt* mRNA を示すバンドは室傍核でのみ観察された。*Oxr* mRNA を示すバンドは室傍核と精巣の両方で観察された。内部標準である *Gapdh* mRNA を示すバンドも室傍核と精巣の両方で観察された。Second PCR により、*Oxt* mRNA を示すバンドが精巣でも観察され、*Oxr* mRNA を示すバンド、*Gapdh* mRNA を示すバンドも室傍核、精巣ともに First PCR よりも強く観察された。これらのことから、野生型ラット精巣において、*Oxt*、*Oxr*、*Gapdh* mRNA が発現することを明らかにした。

精巣の HE 染色

精巣の構造を確認する目的で HE 染色を行った (図 2)。精巣の HE 染色により、精巣の精細管で、精細胞の支持、栄養供給、精子の輸送に関わるセルトリ細胞の核が精上皮の基底側に精祖細胞と並び存在し、精上皮の基底側から管腔側にかけて細胞が伸長している。また、男性ホルモンであるアンドロゲンなどを産生するライディッヒ細胞が精巣の精細管同士の間隙に観察された。

精巣における OXT 発現細胞の同定

野生型ラット精巣において OXT に対する免疫染色を行い、OXT 発現細胞の局在を解析した。結果、一

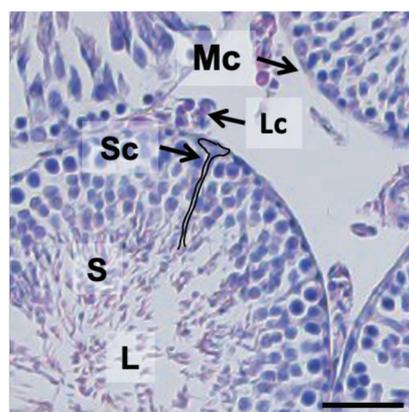


図 2. 精巣の HE 染色。セルトリ細胞を黒線で囲って示した。Lc: ライディッヒ細胞, Sc: セルトリ細胞, Mc: 筋様細胞, S: 精子細胞, L: 内腔。スケールバー: 25 μm。

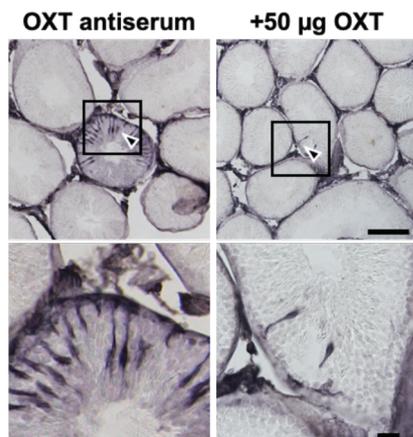


図3. OXT に対する免疫染色と抗体の特異性. 左: OXT 免疫染色, 右: OXT ペプチドを用いた吸収抗体での免疫染色. 線で囲った領域を拡大した. スケールバー: 200 μm (上図), 50 μm (下図).

部の精細管においてセルトリ細胞で OXT 免疫陽性反応が観察された. OXT ペプチドで吸収した抗体を反応させると OXT 陽性反応が著しく減弱した. このことから, OXT がセルトリ細胞で発現することを明らかにした (図3).

精巣における OXT 発現細胞と OXT 受容体発現細胞の局在

次に精巣における OXTR 発現細胞を同定するため, *Oxtr*-tdTomato ラットを用いて, 赤色蛍光シグナル (tdTomato) の局在を解析した. その結果, 一部の精細管のセルトリ細胞において, 赤色蛍光シグナルが観察された (図4) ことから, OXTR がセルトリ細

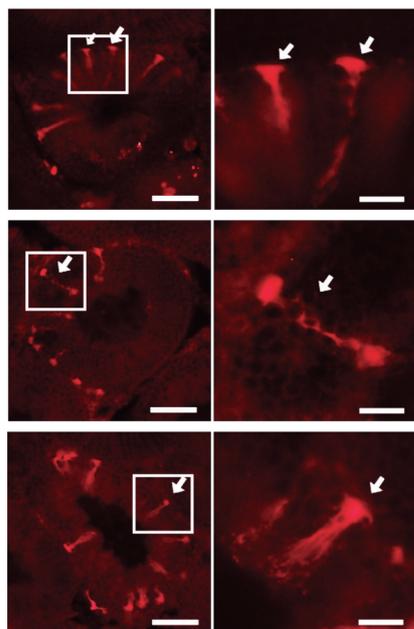


図4. *Oxtr*-tdTomato ラット精巣における tdTomato (OXTR) 発現細胞の局在. 線で囲った領域を拡大した. 矢印: tdTomato 発現細胞. スケールバー: 100 μm (左図), 25 μm (右図).

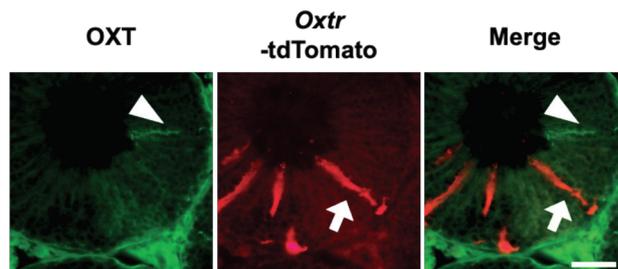


図5. *Oxtr*-tdTomato ラット精巣における OXT 免疫染色. 矢頭: OXT 陽性細胞. 矢印: tdTomato (OXTR) 発現細胞. スケールバー: 50 μm .

胞で発現することが明らかになった. 最後に, OXT 発現細胞と OXTR 発現細胞の局在を比較するため, *Oxtr*-tdTomato ラット精巣において OXT 蛍光免疫染色を行った. その結果, OXT 陽性反応 (緑蛍光) のみが観察された精細管と OXTR の発現を表す赤色蛍光シグナルのみが観察された精細管, あるいは OXT 陽性反応と赤色蛍光シグナルの両方が観察された精細管の3パターンが確認された (図5). また, OXT 陽性反応と赤色蛍光シグナルがともに観察された精細管では, OXT 陽性反応と赤色蛍光シグナルは異なるセルトリ細胞で観察された (図5).

討論

ラット精巣において *Oxt*, *Oxtr* mRNA が発現したことから, 精巣で局所的に OXT, OXTR が合成されることを明らかにした. また, 精巣における OXT 免疫染色の結果, 精巣のセルトリ細胞に OXT 免疫陽性反応が観察されたことから, 精子形成や精子の輸送に係わる精巣セルトリ細胞において OXT が発現・合成されることが示唆された. また, OXT を発現するセルトリ細胞とは異なるセルトリ細胞で OXTR を示すシグナルが観察されたことから, セルトリ細胞で合成される OXT が近傍のセルトリ細胞で発現する OXTR を介して傍分泌的に作用することが示唆された (図6).

ラット精巣に OXTR アンタゴニストを投与すると精子の輸送が遅延される^{9,16,17)}. また, 精巣において, OXT が 5α -リダクターゼの活性や発現を高め, 精子形成を促進する^{8,11-14)}. 今回, OXT と OXTR は異なるセルトリ細胞で発現していたことから, セルトリ細胞で発現する OXT は近傍のセルトリ細胞で発現する OXTR に作用し, 5α -リダクターゼの活性や発現を高めることで精子形成を促進し, 精子の輸送を調節するのかもしれない.

今回, OXT と OXTR が, 一部のセルトリ細胞でのみ観察された. セルトリ細胞には精子形成の段階に伴って, I~XIVのステージが存在する^{18,19)}. またヒツジにおいて, *Oxt* と *Oxtr* mRNA の発現がこ

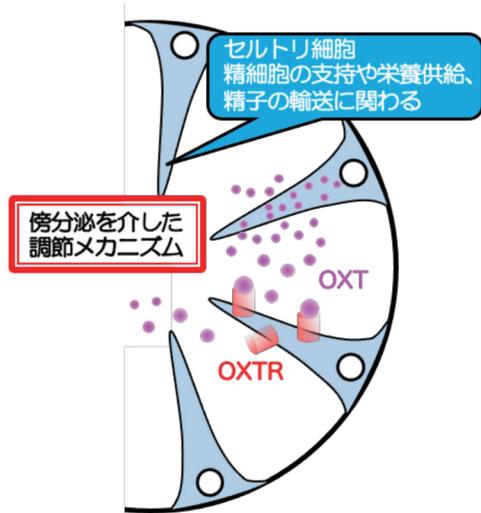


図 6. ラット精巣における OXT 作用機序の模式図. セルトリ細胞で合成される OXT は近傍のセルトリ細胞で発現する OXTR を介して傍分泌的に作用する可能性が示された.

の精子形成のステージに依存的であることが報告されている²⁰⁾. OXT は精細管から精巣上体に精子を放出する排精の促進に関わり^{16, 21)}、ラットのセルトリ細胞上の精子形成段階において、排精は VII~VIII ステージで起こることが知られている¹⁸⁾. 排精が起こる VII~VIII ステージのセルトリ細胞でアンドロゲン受容体 (AR) が発現する²²⁾. *Oxtr*-tdTomato ラット精巣において、AR に対する免疫染色を行うことで、OXTR の発現が排精が起こる VII~VIII ステージで発現することを明らかにできるかもしれない。さらに、近年、ラット精巣において OXT がアンドロゲン結合タンパク質 (ABP) と共発現する可能性が示唆されている²³⁾. 下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) の作用により、ABP が産生され、FSH は XIV~I のステージで分泌量が上昇することが報告されている²²⁾. ライディッヒ細胞から分泌されたテストステロンはセルトリ細胞に取り組み、ABP と結合し、精子成熟に必要な高濃度のテストステロンを精子に提供する。これらのことから、OXT と ABP に対する二重免疫染色を行うことで、OXT が XIV~I のステージのセルトリ細胞で発現することを明らかにできるかもしれない。

ヒト、マーモセット、ヒツジのセルトリ細胞やライディッヒ細胞にて、OXTR 免疫陽性反応がみられることが報告されている^{9, 24)}. 今回、ライディッヒ細胞においては OXT、OXTR ともに特異的なシグナルは観察されなかった。OXTR 発現が精子形成段階や個体の発達段階に依存している可能性がある²⁰⁾ ことから、精子形成段階や発達段階ごとに OXT や OXTR の発現を調べることで、ライディッヒ細胞における OXT や OXTR の発現を明らかにできるかも

しれない。また、ラット精巣において、精細管収縮を引き起こす筋様細胞にて OXT がバソプレシン受容体 (V1a) を介して作用し、精子の輸送に関わることも報告されている²⁵⁾. 今後は V1a の発現局在も解析する必要があるかもしれない。

謝辞

本研究は、研究課題「ラット抹梢臓器における神経ペプチド系の局在」に対する 2020 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成 (RIIS202007) を受けて行われた。記して感謝する。

文献

- 1) Freund-Mercier MJ, Moos F, Poulain DA, Richard P, Rodriguez F, Theodosis DT and Vincent JD (1988) Role of central oxytocin in the control of the milk ejection reflex. *Brain Res. Bull.* **20**: 737-741.
- 2) Dalmazzo A, Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira IVA, Goissis MD, Francischini MCP, Lopes E, Minazaki CK, Blank MH, Cogliati B, Pereira RJG, Barnabe VH and Nichi M (2019) Immunolocalisation and expression of oxytocin receptors and sex hormone-binding globulin in the testis and epididymis of dogs: correlation with sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* **31**: 1434-1443.
- 3) Oti T, Sakamoto T and Sakamoto H (2021) Systemic effects of oxytocin on male sexual activity via the spinal ejaculation generator in rats. *Commun. Integr. Biol.* **14**: 55-60.
- 4) Oti T, Satoh K, Uta D, Nagafuchi J, Tateishi S, Ueda R, Takanami K, Young LJ, Galione A, Morris JF, Sakamoto T and Sakamoto H (2021) Oxytocin influences male sexual activity via non-synaptic axonal release in the spinal cord. *Curr. Biol.* **31**: 103-114 e105.
- 5) Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R and Einspanier A (1997) Oxytocin and male reproductive function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **424**: 253-264.
- 6) Vongpralub T and Fukashi K (1994) Effects of Oxytocin on Sperm Motility and In Vitro Fertilization in the Mouse. *Nihon Chikusan Gakkaiho* **65**: 695-700.
- 7) Frayne J, Townsend D and Nicholson HD (1996) Effects of oxytocin on sperm transport in the pubertal rat. *J. Reprod. Fertil.* **107**: 299-306.
- 8) Frayne J and Nicholson HD (1995) Effect of oxytocin on testosterone production by isolated rat Leydig cells is mediated via a specific oxytocin receptor. *Biol. Reprod.* **52**: 1268-1273.
- 9) Inaba T, Nakayama Y, Tani H, Tamada H, Kawate N and Sawada T (1999) Oxytocin gene expression and action in goat testis. *Theriogenology* **52**: 425-434.
- 10) Sawada T, Uemura K, Tamada H, Inaba T and Mori J (1998) Effects of oxytocin and prostaglandin F2 α on androgen production of adult rat testis in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **55**: 121-126.
- 11) Assinder SJ (2008) Oxytocin increases 5 α -reductase activity of human prostate epithelial cells, but not stromal cells. *Prostate* **68**: 115-121.

- 12) Assinder SJ, Johnson C, King K and Nicholson HD (2004) Regulation of 5alpha-reductase isoforms by oxytocin in the rat ventral prostate. *Endocrinology* **145**: 5767-5773.
- 13) Killian J, Pratis K, Clifton RJ, Stanton PG, Robertson DM and O'Donnell L (2003) 5alpha-reductase isoenzymes 1 and 2 in the rat testis during postnatal development. *Biol. Reprod.* **68**: 1711-1718.
- 14) Nicholson HD and Jenkin L (1994) 5α-Reductase activity increased by oxytocin in the rat testis. In: *Function of Somatic Cells in the Testis*. Barke A, ed. Springer. pp.278-285.
- 15) Assinder SJ, Carey M, Parkinson T and Nicholson HD (2000) Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **63**: 448-456.
- 16) Assinder SJ, Rezvani A and Nicholson HD (2002) Oxytocin promotes spermiation and sperm transfer in the mouse. *Int. J. Androl.* **25**: 19-27.
- 17) Thackare H, Nicholson HD and Whittington K (2006) Oxytocin: its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum. Reprod. Update.* **12**: 437-448.
- 18) Shima Y, Miyabayashi K, Matsuzaki S, Inoue M and Morohashi K (2014) 出生後の精巣における胎仔型ライディッヒ細胞の細胞運命と生理機能の解明. 日本生殖内分泌学会雑誌 **19**: 45-50.
- 19) 石田仁男 (1987) ラット精細管の電顕的細胞化学的研究: 発育段階におけるホスファターゼ局在の変化. 日本泌尿器科学会雑誌 **78**: 973-981.
- 20) Whittington K, Assinder SJ, Parkinson T, Lapwood KR and Nicholson HD (2001) Function and localization of oxytocin receptors in the reproductive tissue of rams. *Reproduction* **122**: 317-325.
- 21) Anjum S, Anuradha A and Krishna A (2018) A possible direct action of oxytocin on spermatogenesis and steroidogenesis in pre-pubertal mouse. *Andrologia*.
- 22) Kumar A, Raut S and Balasinor NH (2018) Endocrine regulation of sperm release. *Reprod. Fertil. Dev.* **30**: 1595-1603.
- 23) Herbert Z, Weigel S, Sendemir E, Marshall A, Caldwell JD, Petrusz P, Peuckert C and Jirikowski GF (2005) Androgen-binding protein is co-expressed with oxytocin in the male reproductive tract. *Anat. Histol. Embryol.* **34**: 286-293.
- 24) Einspanier A and Ivell R (1997) Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. *Biol. Reprod.* **56**: 416-422.
- 25) Howl J, Rudge SA, Lavis RA, Davies AR, Parslow RA, Hughes PJ, Kirk CJ, Michell RH and Wheatley M (1995) Rat testicular myoid cells express vasopressin receptors: receptor structure, signal transduction, and developmental regulation. *Endocrinology* **136**: 2206-2213.